

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年2月26日 (26.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/016280 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 39/04,
39/00, C12N 15/11, 15/31
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010303
- (22) 国際出願日: 2003年8月13日 (13.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-237610 2002年8月16日 (16.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町4丁目1番8号 Saitama (JP). 国立感染症研究所長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES) [JP/JP]; 〒162-8640 東京都 新宿区 戸山1-23-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 本多 三男
- (HONDA, Mitsuo) [JP/JP]; 〒181-0013 東京都 三鷹市 下連雀2-5-11 Tokyo (JP). 松尾 和浩 (MAT-SUO, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒214-0012 神奈川県 川崎市 多摩区 中野島6-29-3-403 Kanagawa (JP). 兼清 優 (KANEKIYO, Masaru) [JP/JP]; 〒164-0011 東京都 中野区 中央3-25-12 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都 渋谷区 宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): IN, JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: RECOMBINANT BCG VACCINE

(54) 発明の名称: 組換えBCGワクチン

(57) Abstract: A recombinant BCG vaccine obtained by transformation with an expression vector carrying a polynucleotide coding for an ecemic antigenic protein, which recombinant BCG vaccine consists of a modified type polynucleotide comprising a polynucleotide having the third base of each of the codons thereof substituted with G or C without changing of the type of amino acid. This recombinant BCG vaccine excels in the amount of antigenic protein expressed, so that even with the same dosage as employed for conventional BCG vaccines, the recombinant BCG vaccine can induce satisfactory immune response to target infectious diseases, cancer, etc.

(57) 要約: 外来性の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有する発現ベクターによって形質転換された組換えBCGワクチンであって、ポリヌクレオチドの各コドンの第3番目塩基がアミノ酸の種類を変化させることなくGまたはCに置換された改変型ポリヌクレオチドである。この組換えBCGワクチンは、抗原性タンパク質の発現量に優れ、その結果として通常のBCGワクチンと同程度の使用量によっても、標的とする感染症や癌等に対して十分な免疫応答を誘導することができる。

WO 2004/016280 A1

明細書

組換え BCG ワクチン

5

技術分野

この出願の発明は、組換え BCG ワクチンに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、少ない用量で外来性抗原タンパク質に対する十分な免疫
10 応答を誘導することのできる組換え BCG ワクチンに関するものである。

背景技術

15 牛型結核菌弱毒 BCG 株 (Mycobacterium bovis BCG。以下「BCG」と記載する) は、その安全性から、最も一般的な生バクテリアワクチンとして知られている。

一方、この十数年来の遺伝子組換え技術の開発、向上に伴い、ウイルスや細菌
20 などの微生物に外来性の抗原性タンパク質を発現させるように改変して、様々な感染症や癌の予防および治療に対するワクチンベクターとして応用しようという研究が盛んに行われて来ている。BCG についても、例えばヒト免疫不全ウイルス (HIV) やサル免疫不全ウイルス (SIV) を標的とする組換え BCG ワクチンが報告されている (J. Immunol. 164:4968-4978, 2000; J. Virol. 71:2303-2309, 1997; Infect. Immun. 57:283-288, 1989)。
25

BCG 株は、その安全性と供給が容易であるという点において優れた組換えワクチンの候補である。しかしながら、従来の組換え BCG ワクチンの場合には、標的となる感染症や癌等に対する免疫誘導能の点においては必ずしも十分なもので
30 ではなかった。例えば、HIV-1 を標的とする組換え BCG ワクチンを用いてモル

モットに免疫誘導を行った場合には、通常の BCG ワクチンのヒトへの使用量 (0.05-0.1mg) の 10~100 倍の量を投与する必要がある (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:10698-10697, 1995)。

5 一方、組換えワクチンにおいて、外来抗原タンパク質に高い免疫原性を与える手段として、コドンの最適化が試みられている。すなわち、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) のリステリオリシン (listeriolysin) O (J. Immunol. 161 : 5594-5599, 1998)、HIV-1 Gag (J. Virol. 75 : 10991-11001, 200; J. Virol. 74 : 2628-2635, 2000)、Env (J. Virol. 72 : 1497-1503, 1998)、破傷風毒素 (Vaccine 19 : 810-815, 2000)、ヒトパピローマウイルスの L1 タンパク質 (J. Virol. 75 : 9201-9209, 2001)、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) のメロゾイト表面タンパク質 1 (Infect. Immun. 69 : 7250-7253, 2001) などのコドン最適化が報告されている。しかしながら、これらのコドン最適化は、各抗原タンパク質のアミノ酸コドンをヒト
10 化したものである。また、組換えワクチンも DNA ワクチン (naked DNA) であり、BCG 株等の他の組換えベクターを主成分とするワクチンにおいては、コドン最適化の効果は全く報告されていない。

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、抗原
20 性タンパク質の発現量に優れ、その結果として通常の BCG ワクチンと同程度の使用量によっても、標的とする感染症や癌等に対して十分な免疫応答を誘導することのできる組換え BCG ワクチンを提供することを課題としている。

25

発明の開示

この出願の発明は、前記の課題を解決するための発明として、外来性の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有する発現ベクターによって形質転換された組換え BCG ワクチンであって、前記ポリヌクレオチドの各コドンの
30 第 3 番目塩基がアミノ酸の種類を変化させることなく G または C に置換された

改変型ポリヌクレオチドである組換え BCG ワクチンを提供する。

この組換え BCG ワクチンにおいては、改変型ポリヌクレオチドの各コドンの全塩基が、アミノ酸の種類を変化させることなく G または C を多く含むように置換されていることを好ましい態様の一つとしている。

なおこの発明において、「ポリヌクレオチド」とはプリンまたはピリミジンが糖に β -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル (ATP、GTP、CTP、UTP；または dATP、dGTP、dCTP、dTTP) が結合した分子を意味する。また、「タンパク質」および「ペプチド」とは、アミド結合 (ペプチド結合) によって互いに結合した複数個のアミノ酸残基から構成された分子を意味する。

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 等に記載されている。

図面の簡単な説明

図 1 は、pNL4-3 由来の p24 遺伝子のヌクレオチド配列と推定されるアミノ酸配列、およびマイコバクテリアの最適コドンをもつ合成 HIV-1 gag p24 遺伝子のヌクレオチド配列である。pUC-hspK ベクターへのクローニングのため、この DNA フラグメントの 5' および 3' 末端に BamHI および ApaI 認識部位を付加した。星印は pNL4-3 p24 遺伝子との同一配列を示す。

図 2 は、発現ベクター pSO-p24Mu および pSO-p24WT の構造を示した模式図

である。(A)は HIV-1 p24 の発現ユニットの模式図である。それぞれの矢印および黒四角は、hsp60 プロモーターおよびターミネーターの転写方向を示している。灰色、黒色、および白のバーは、各々マイコバクテリアの DNA フラグメント、改変型 p24 遺伝子、および p24 遺伝子の PCR フラグメントを示す。(B)は発現ベクター pSO-p24Mu および p24Wt の詳細である。Ori-M および Km^r は、各々マイコバクテリアの複製起点およびカナマイシン耐性遺伝子を示す。

図 3 は、rBCG-p24Mu および rBCG-p24Wt の p24 発現レベルおよび増殖速度を比較した結果である。(A)は、抗 p24 モノクローナル抗体 (V107) に反応するタンパク質をウェスタンブロットによって可視化した。レーン 1 は rBCG-p24Wt の溶解産物、レーン 2 は rBCG-p24Mu の溶解産物、レーン 3 は pSO246 を含む rBCG の溶解産物 (ネガティブコントロール) である。(B)は rBCG-p24Mu および rBCG-p24Wt の全細胞溶解物における p24 濃度の比較である。1ml の各培養物から rBCG 細胞を定期的に回収し、超音波処理し、市販の p24 抗原 EIA により試験した。黒および白四角はそれぞれ rBCG-p24Mu および p24Wt を示す。データは異なるクローンの平均値 \pm s.d.を示す。(C)は組換え体クローンにおける増殖速度の動性である。1ml の各培養物を定期的に回収し、470 nm における O.D.を測定し、以下に示したとおりに吸光度から細胞密度を計算した；

$$\text{密度} (\mu\text{g/ml}) = 470 \text{ nm の吸光度} \times 1412.3 + 73.063$$

密度から cfu を変換し、プロットした。黒四角、白四角、白丸はそれぞれ、rBCG-p24Mu、-p24Wt、および pSO246 を示す。データは異なるクローンの平均値 \pm s.d.を示す。

図 4 は、rBCGs で免疫化したマウスにおける細胞性および体液性免疫反応である。(A)は Gag p24 重複ペプチドに対するリンパ球増殖である。増殖活性は刺激指数 (SI) で示した。黒および白カラムはそれぞれ rBCG-p24Mu および p24Wt で免疫したマウスの SI 値を示す。データは各マウス群の平均 SI 値 \pm s.d.を示す。星印は統計的有意差 (*は $p < 0.02$ 、**は $p < 0.002$) を示す。(B)は ELISPOT アッセイによる抗原特異的 IFN- γ 分泌細胞の測定。黒、白および灰色カラムはそれぞれ rBCG-p24Mu、-p24Wt および pSO246 で免疫したマウスの SFC 数を示す。データは各マウス群の SFCs/10⁶ 細胞の平均数 \pm s.d.を示す。星印は統計的有意差 (*は rBCG-p24Wt 免疫マウスに対する $p < 0.05$) を示す。(C)は各 rBCG で免疫した

マウスの血漿中における抗 p24 特異的抗体および抗 PPD 特異的 IgG 抗体。黒、白および灰色カラムはそれぞれ rBCG-p24Mu、-p24Wt および pSO246 で免疫したマウスの log2 の逆数力価である。力価は終点 ELISA にほって決定した。データは各マウス群の平均力価 + s.d. を示す。

5

発明を実施するための最良の形態

この発明の組換え BCG ワクチンは、外来性の抗原性タンパク質をコードする
10 ポリヌクレオチドを保有する発現ベクターによって形質転換された組換え BCG
を有効成分とする。そして、外来性の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレ
オチドが、コードする抗原性タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の
種類を変化させないという条件で、各アミノ酸残基をコードするコドンの第3番
15 目塩基が G（グアニン）または C（シトシン）に置換された改変型ポリヌクレオ
チドであることを特徴としている。

コドンの置換は、具体的には表1に示したとおりである（「至適コドン」の
欄）。すなわち、例えばグリシン（Gly）をコードするコドンは、GGT、GGC、
GGA および GGG の4種類であるが、上記の基準に合致する Gly コドンは GGC
20 または GGG である。従って、任意の抗原性タンパク質のアミノ酸配列における
Gly コドンが GGT または GGA である場合には、第3番目の T（チミン）また
は A（アデニン）は、C または G に置換される。

表 1

アミノ酸			コドン						至適コドン		
グリシン	Gly	G	GGT, GGC, GGA, GGG						GGC, GGG		
アラニン	Ala	A	GCT, GCC, GCA, GCG						GCC, GCG		
バリン	Val	V	GTT, GTC, GTA, GTG						GTC, GTG		
ロイシン	Leu	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG						CTC, CTG, TTG		
イソロイシン	Ile	I	ATT, ATC, ATA						ATC		
セリン	Ser	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC						TCC, TCG, AGC		
スレオニン	Thr	T	ACT, ACC, ACA, ACG						ACC, ACG		
システイン	Cys	C	TGT, TGC						TGC		
メチオニン	Met	M	ATG						ATG		
アスパラギン	Asn	N	AAT, AAC						AAC		
グルタミン	Gln	Q	CAA, CAG						CAG		
フェニルアラニン	Phe	F	TTT, TTC						TTC		
チロシン	Tyr	Y	TAT, TAC						TAC		
トリプトファン	Trp	W	TGG						TGG		
アスパラギン酸	Asp	D	GAT, GAC						GAC		
グルタミン酸	Glu	E	GAA, GAG						GAG		
ヒスチジン	His	H	CAT, CAC						CAC		
リジン	Lys	K	AAA, AAG						AAG		
アルギニン	Arg	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG						CGC, CGG, AGG		
プロリン	Pro	P	CCT, CCC, CCA, CCG						CCC, CCG		

この発明においては、各コドンの全ての塩基はさらに、それがコードするアミノ酸残基の種類を変化させない条件で、G または C を多く含むように置換されていることを好ましい態様としている。このような置換は、具体的には、ロイシン (Leu) およびアルギニン (Arg) に適用される。すなわち、表 1 に示した至適コドンのうち、Leu コドンとしては、T を 2 個含むコドン (TTG) よりも、CTC または CTG が好ましく選択される。また、Arg コドンとしては、A を含むコドン (AGG) よりも、CGC または CGG が好ましく選択される。

以上のとおりのコドン置換は、以下の知見に基づいている。すなわち、BCG ゲノムは G+C 含量の高い DNA から成り、コドンの 3 番目の位置は GC ペアを強く好むことが知られている (J. Virol. 75:9201-9209, 2001; Infect. Immun. 57:283-288, 1989)。また、BCG 遺伝子についての集積された情報 (Nucl. Acids Res. 28:292, 2000) から、Arg の AGA コドンおよび Leu の TTA コドン

の使用頻度は極めて低いこと（全コドンの 0.9%および 1.6%）も知られている。一方、例えば、HIV-1 はコドンの 3 番目の位置に AT ペアを好むことが知られている。すなわち、HIV-1 p24 遺伝子のコード配列においては、11 個の Arg コドンのうち 9 個が AGA を用い、また 18 個の Leu コドンのうち 6 個が TTA を用
5 いている。コドン使用頻度の好みは、単細胞生物では対応するアミノアシル tRNA 量と相関関係があることが一般的に知られている（Nature 325:728-730, 1987; Mol. Biol. Evol. 2:13-34, 1985）が、HIV-1 p24 遺伝子において好まれる Arg コドン（AGA）および Leu コドン（TTA）用のアミノアシル tRNA 量は BCG 細胞においては極めて低いと考えられる。

10

従って、この発明においては、BCG 細胞において特に好まれるコドン使用頻度（すなわち、コドンの第 3 番目塩基が G または C、さらには G または C をできるだけ多く含むコドン）に合致した塩基配列となるように、外来性の抗原性ポリヌクレオチドを置換するようにしている。

15

各コドンに対応した好ましい塩基置換をポリヌクレオチドに導入するには、公知の Kunkel 法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985 および Methods in Enzymology 154:367, 1987）や、ミューテーション・キット等を使用する方法、あるいは変異導入型の PCR 法などを採用することができる。

20

BCG 株は、結核の予防接種等に使されている公知のものを対象とすることができる。また、BCG 株に導入する発現ベクターは、従来の組換え BCG ワクチンの作成に使されているような、BCG 用ベクター（例えばプラスミド pSO246 等）を使用することができる。このベクターのクローニングサイトに、
25 外来性（すなわち、BCG 以外）の任意の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入することによって発現ベクターを構築することができる。なお、以下の記載では、外来性の抗原性タンパク質を「外来ポリペプチド」、これをコードするポリヌクレオチドを「外来ポリヌクレオチド」と記載することがある。また、外来ポリヌクレオチドには、BCG 株由来の任意のプロモーターおよびターミネーター配列（例えば BCG 株由来の熱ショックタンパク質(Hsp60)のプロ
30

モーターおよびターミネーター配列)等を連結することによって、外来ポリペプチドを良好に発現させるようにする。

- 外来ポリヌクレオチドは、BCG 株以外の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチド（例えば、cDNA 断片）であり、外来ポリペプチドは生体内で抗原抗体反応を惹起するものであれば如何なるものであってもよい。具体的にはヒト後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス（HIV）の gag 前駆体 p55 または p24 タンパク質、env タンパク質 gp120 または gp160、pol 前駆体タンパク質、nef タンパク質、tat タンパク質等を対象とすることができる。また、サル免疫不全ウイルス（SIV）由来の同様の抗原性ポリペプチドを使用することもできる。あるいは、その他の病原体（他の病原性ウイルスや細菌）、もしくは癌細胞の抗原タンパク質をコードするポリヌクレオチド等を用いることもできる。
- 外来ポリヌクレオチドの取得方法としては、外来ポリペプチドをコードするゲノム遺伝子またはその cDNA がクローン化されたプラスミドからその実質的な配列であるポリヌクレオチドを適当な制限酵素で切り出すか、適当な配列のプライマーを用いた polymerase chain reaction (PCR) により増幅すればよい。クローン化されていない場合は、その遺伝子を持つ細菌、動物のゲノム DNA を、ウイルスの場合はウイルスが感染した動物細胞由来の DNA または RNA を鋳型として、上記 PCR 法により DNA 断片を増幅することにより得ることができる。

- このようにして構築した発現ベクターを、塩化カルシウム法や電気穿孔法等の公知の方法で BCG 株に導入し、形質転換菌の外来ポリペプチドの発現をウエスタンブロットや公知の免疫測定法（例えば ELISA 法等）によって確認することによって、この発明の組換え BCG を作成することができる。

このようにして作成した組換え BCG を、通常の BCG ワクチンと同様の液状担体に懸濁することによって、組換え BCG ワクチンを作成することができる。

実施例

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

1. 材料および方法

1.1. 試薬

組換え DNA のための全ての酵素および大腸菌 HB101 コンピテント細胞は、Takara Bio Inc. (東京、日本) より購入した。野性型 HIV-1 p24 遺伝子増幅用のプライマーは、ESPEC Oligo Service Co. Ltd. (筑波、日本) から入手した。抗 HIV-1 Gag p24 モノクローナル抗体 V107 は、Dr. Ikuta (大阪大学) より提供された。ウェスタン免疫ブロット分析のためのペルオキシダーゼ結合抗マウス IgG は、New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) より購入した。

1.2. p24 発現ベクターの構築および BCG の形質転換

遺伝子操作は、大腸菌 HB101 コンピテント細胞を用いて行った。マイコバクテリア株は、BCG Tokyo ワクチン株を使用した。組換え BCG (rBCG) の培養のための培地は、アルブミンデキストロース複合体を含む Middlebrook 7H9 ブロス (7H9-ADC; BBL Microbiology System, Cockeysville, MD) を使用した。

BCG の hsp60 遺伝子をコードする DNA フラグメント (Infect. Immun. 55:1466-75, 1987) を、pUC18 の SmaI-SalI 部位へクローニングした (pUC-hsp60)。マルチクローニングサイトおよび hsp60 遺伝子のターミネーター領域に相当する合成 DNA フラグメントを pUC-hsp60 の MunI-KpnI 部位にクローニングし、次いで EcoRI 部位に KpnI リンカーを挿入し、pUC-hspK ベクターを構築した。サブタイプ B ウイルスの gag p24 遺伝子は、pNL4-3 プラスミド (J. Virol. 59:284-291, 1986) から PCR 増幅した。PCR プライマーは以下を使用した。

フォワード : AATGGATCCTATAGTGCAGAACCTC

(配列番号 1 : 下線は BamHI 部位)

リバース : AATGGGCCCTTACAAAACCTCTTGCTTTATGG

(配列番号 2 : 下線は ApaI 部位)

この PCR 産物 (野生型 p24 遺伝子) を、pUC-hspK の BamHI-ApaI 部位に

5 翻訳枠を一致させてクローニングし、pUC-hspK-p24Wt を構築した。

一方、p24 遺伝子の全塩基配列が、BCG における至適コドンとなるように、
公知の合成法を用いて合成 DNA 断片を作成し、この合成 DNA 断片 (改変型
p24 遺伝子) を pUC-hspK ベクターの前記と同一部位にクローニングした
(pUC-hspK-p24Mu) 。pNL4-3 由来の野生型 p24 配列と改変型 p24 配列は

10 図 1 に示したとおりである。これらの組換えベクターを KpnI によって消化し、
p24 発現ユニットを含む小フラグメント (hps-p24Wt および hps-p24Mu、図
2A) を、安定な大腸菌-マイコバクテリアシャトルベクターである pSO246
(FEMS Microbiol. Lett. 135:237-243, 1996) の KpnI 部位にサブクローニ
ングし、発現ベクター pSO-p24Wt および pSO-p24Mu をそれぞれ構築した。

15 発現ベクター構築の概略は図 2B に示したとおりである。これらの発現ベクター
および pSO246 を、文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6987-6991,
1988) の記載に従って Gene-Pulser (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules,
CA) を用いて BCG に形質導入し、20 μ g/ml のカナマイシン含有の OADC 強
化剤 (BBL Microbiology Systems) を補充した Middlebrook 7H10 寒天プレ
20 ート上で形質転換体を選択した。その結果、pSO-p24Wt、pSO-p24Mu および
pSO246 をそれぞれ含む組換えクローシ rBCG-p24Wt、rBCG-p24Mu および
rBCG-pSO246 を得た。

1.3. ウェスタンブロット分析

25 rBCG の形質転換体を、7H10-ADC ブロス中で 2 週間増殖させた。培地の一
部を定期的に収集し、超音波処理し、Multi Gel 4/20 (Daiichi Pure
Chemical Co. Ltd., 東京、日本) を用いてドデシル硫酸ナトリウムポリアクリ
ルアミドゲル (SDS-PAGE) 電気泳動に供した。分画したタンパク質をニトロ
セルロースフィルター上にエレクトロブロットし、V107 モノクローナル抗体
30 (J. Gen. Virol. 73:2445-2450, 1992) と反応させ、二次抗体としてアルカリ

フォスファターゼ標識抗マウス IgG と反応させた後、NBT（ニトロ ブルー テトラゾリウム クロライド）／BCIP（5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル フォスフェート、トルイジン塩）基質（Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany）を用いて可視化した。

5

1.4. rBCGs における Gag p24 抗原量の測定

rBCG の形質転換体を、7H9-ADC プロス中で2週間増殖させた。培地の一部を定期的に収集し、超音波処理した。細胞抽出物中の p24 抗原濃度は、市販の抗原 EIA（HIVAG-1MC, Abott Laboratories, Abott Park, IL）によって決定した。p24 タンパク質の発現は、菌の 10^8 コロニー形成ユニット（colony-forming units: cfu）当たりの p24 タンパク質濃度として表した。

10

1.5. モルモットにおける遅延型過敏症（DTH）反応

Hartley 系雌モルモット（体重約 350g）に、rBCG（0.1-5mg/0.1ml 生理食塩水）を皮下投与して免疫した（ $n=3$ ）。DTH 皮膚反応を調べるため、 $100\mu\text{l}$ の生理食塩水あたり $0.1\mu\text{g}$ の精製ツベルクリンタンパク質誘導体（PPD）、 $10\mu\text{g}$ または $1\mu\text{g}$ の組換え HIV_{III}B Gag p24 タンパク質（Immuno Diagnostics, Inc. Woburn, MA）を、rBCG 免疫化モルモットに各々皮内注射した。ネガティブコントロールには生理食塩水を用いた。24 時間後、皮膚反応を測定した。

15
20

1.6. マウスと免疫化

6-8 週齢の雌 BALB/c(H-2^d)マウスは Charles River Japan Inc.（横浜、日本）から購入した。マウスは実験に使用する前に 1 週間以上、動物実験施設に馴化させ、日本感染症研究所のガイドラインに従って SPF 条件下の施設内で飼育した。実験は、バイオセーフティーに関する研究所のコミッティーの承認および国際保健機構（WHO）の規定に基づいたバイオセーフティーレベル 2 の基で実施した。

25

1.7. 単一細胞懸濁液の調製

皮内接種の 10 週後に全てのマウスを屠殺し、細胞濾過フィルター（Becton

30

Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を介して脾臓からの単一細胞を単離した。溶血の後、細胞を完全培地 (CM; 10% 熱不活性化 FCS、 5.5×10^{-5} M β -メルカプトエタノール、50 U/ml ペニシリンおよび 50 μ g/ml ストレプトマイシンを含有する RPMI 1640) に再懸濁した。

5

1.8. リンパ球増殖試験

単一細胞懸濁液を、CM 中で 2×10^6 細胞/ml に調整した。等量の細胞懸濁液と CM または HIV-HXB2 Gag 重複ペプチド (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program) を 50 μ l/ml 濃度で含む CM とを混合し、培地
10 または 25 μ g/ml のペプチド含有培地の細胞終濃度を 1×10^6 細胞/ml とした。使用した重複ペプチドは、Gag p24 領域をカバーする p11 (LERFAVNPGLLETSE: 配列番号 4) から P35 (NIQGQMVHQAI SPRT: 配列番号 5) までであり、5 個のペプチド毎にプールのもの、または全てプールのものを刺激に使用した。ペプチド有りまたは無しの細胞懸濁液は、丸底 96 穴
15 プレート (Corning Inc., Corning, NY) に 3 重に添加し、37℃、5% CO₂、加湿した環境下で 48 時間インキュベートした。回収の 6 時間前、1 μ Ci の [³H]-チミジンを追加し、ガラスファイバーフィルター (GF/C; PerkinElmer Life Science Inc., Boston, MA) で回収し、次いで液体シンチレーションカウンター (TopCount; PerkinElmer Life Science Inc.) により細胞内に取り込まれた
20 [³H]-チミジン量をカウントした。

1.9. ELISPOT 検定

HIV Gag p24 および PPD に特異的な INF γ 分泌細胞を、マウス IFN- γ Development Module と ELISPOT Blue Color Module (R&D Systems Inc.,
25 Minneapolis, MN) によって検定した。すなわち、脾臓からの単一細胞懸濁液を、25 μ g/ml の Gag 重複ペプチド (p11-35)、5 μ g/ml の組換え p24 タンパク質、または 2.5 μ g/ml のツベルクリン精製タンパク質誘導体 (PPD) が存在する、または存在しない CM 中で、37℃、5% CO₂、加湿した環境下で 48 時間にわたりインキュベートした。インキュベーション後、細胞を RPMI1640 培
30 地で 1 回洗い、CM 中に再懸濁した。検出用の 96 穴ニトロセルロースプレート

(Millititer HA; Millipore Co., Bedford, MA) を捕捉抗体でコート (4℃、一晩) し、PBS で洗浄後、CM で 3 時間ブロッキングして、100 μ l の刺激細胞を様々な濃度で各ウェルに添加し、37℃、5% CO₂、加湿した環境下で 16 時間インキュベートした。次いで、0.05% の Tween 20 含有の PBS (PBS-T) でプレート

5 プレートを洗浄し、検出抗体と共にインキュベートした。4℃一晩のインキュベーションの後、プレートを PBS-T で洗浄し、アルカリフォスファターゼを結合したストレプトアビジンと共に室温で 2 時間インキュベートした。PBS-T で洗浄の後、プレートに NBT/BCIP 基質を加えて室温で可視化した。次いで、プレートを水で洗浄し、乾燥させ、スポット形成細胞 (spot forming cells; SFCs) を定

10 量化した。KS ELISPOT compact system (Carl Zeiss, Berlin, Germany) を用いてウェルを画像化し、SFCs を計測した。SFC は、不明瞭な縁を持った暗青色のスポットとして規定した (J. Virol. 76:875-884, 2002)。有意レベルを決定するため、各刺激に対する SFC の平均値および標準偏差値を用いてベースラインとした。この平均および 2 倍の標準偏差に対応する棄却値を次に決定した。

15 もし、SFC 数が無刺激サンプルの棄却値を超えた場合には反応をポジティブと見なした。

1.10. ELISA

血液を 10,000 g で 5 分間遠心して血漿を得た。全てのサンプルは使用まで -80℃で貯蔵した。PPD および p24 に特異的な血漿中 IgG の力価は終点 ELISA

20 によって決定した。96 穴マイクロタイタープレート (MaxiSorp™; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) を、重炭酸緩衝液 (35 mM NaHCO₃, 15 mM Na₂CO₃, 0.02% NaN₃, pH9.6) を用い 1 μ g/ml の rp24 または PPD を、4℃にて一晩コートした。PBS-1%BSA を用いて、4℃で一晩にわたってウェルをブロックした後、PBS-T でプレートを 3 回洗浄した。PBS-1%BSA を用いて 1/2⁴ で希釈を

25 始め、2 倍段階希釈した希釈物を、抗原コートしたウェルに 100 μ l/well の量加えた。4℃で一晩インキュベートした後、プレートを洗浄し、PBS-T で 1/2000 に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス IgG (H + L) (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) と共にイン

30 キュベートした。37℃で2時間のインキュベーションの後、プレートを洗浄し、

テトラメチル-ベンジジン基質 (TMB+; DaKoCytomation A/S, Copenhagen, Denmark) を用いて 15 分間暗所室温で可視化した。反応は、1 M HCl, 0.5 M H₂SO₄ を用いて停止させた。終点の力価は、最高希釈の log2 の逆数として算出した。これは、ネガティブコントロールの 450nm における吸光度 (OD₄₅₀) より上でかつ、吸光度 0.100 以上の OD₄₅₀ をもたらす。

2. 結果

2.1. HIV-1 遺伝子のマイコバクテリアコドン最適化とその発現ベクターの構築
10 合成した改変型 p24 遺伝子を、図 1 に示したように設計した。合成 p24 遺伝子のコード領域における全 G+C 含有量は 67.4% であり、pNL4-3 由来の野性型 p24 遺伝子の 43.4% よりも高い。これらの二つの遺伝子は最初に pUC-hspK ベクターにクローニングし (図 2A)、次いで pSO264 にサブクローニングした (図 2B)。hsp60 プロモーターを有する各発現ベクターは、BCG Tokyo ワク
15 チン株に導入し、マイコバクテリア最適コドン使用頻度を有する p24 遺伝子を含む rBCG-p24Mu と、野性型コドン使用頻度を有する p24 遺伝子を含む rBCG-p24Wt をそれぞれ選択した。

2.2. コドン最適化 HIV 遺伝子の挿入による in vitro における HIV 遺伝子発
20 現の有意な増大

2 種類の BCG-HIV 組換え体の HIV-1 gag p24 遺伝子発現レベルを比較するため、培養 rBCG の増殖曲線の動性を調べ、さらに p24 抗原タンパク質の検出によって HIV 抗原の産生能を調べた (図 3)。2 週間の培養時点において、rBCG-p24Mu および p24Wt のそれぞれの溶解物における組換え p24 タンパク
25 質はウェスタンブロット分析により同じく約 24kDa の単一バンドとして検出された。rBCG-p24Mu の p24 抗原の発現レベル (菌体 10⁸ cfu 当たり 175.0 ± 25.1 ng) は rBCG-p24Wt のそれ (菌体 10⁸ cfu 当たり 4.7 ± 0.3 ng) よりも 37.0 倍増加した (図 3B)。rBCG-p24Mu および rBCG-p24Wt の増殖曲線は、対照の rBCG-pSO246 形質転換体と比較して正常であり、細胞培養の 21 日目
30 にピークに達した (図 3C)。このことは、p24 抗原の生産は培養 rBCG-

p24Mu の増殖率に相関することを示唆している。このように、コドン最適化した HIV gag p24 遺伝子を挿入した BCG 形質転換体は、菌体 10^8 cfu 当たりほぼ 200 ng の p24 抗原、またはコドン最適化 rBCG-HIV の 1 mg 当たり 200 ng の p24 抗原を産生することが可能である。

5

2.3. モルモットにおける DTH 反応

免疫応答に対する改変型 p24 の発現の効果を評価するため、まずモルモットにおける DTH 皮膚反応を調べた。以前の報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10693-10697, 1995) では、V3 エピトープに特異的な DTH 反応を検出するためには、5mg を接種することが必要であった。一方、改変型 p24 を産生する rBCG-p24Mu を用いた場合には、表 2 に示したように、0.1mg 量の接種によって、5mg の rBCG-V3J1 接種の場合と同様の p24 に対する著しい DTH 反応を検出することができた。なお、rBCG-p24Mu および rBCG-p24Wt でそれぞれ免疫化されたモルモットの間には、何ら異なる反応性は観察されなかった。

15

表 2

rBCG-p24 免疫化モルモットにおける HIV-1 Gag 抗原特異的 DTH 誘導の感度

免疫化	対 PBS	対 PPD	対 Gag 抗原	
		0.1 μ g	1 μ g	10 μ g
rBCG-p24WT 0.1 mg/s.c.	0	15.0	0	10.0
rBCG-p24Mu 0.1 mg/s.c.	0	14.5	0	10.0
5mg/s.c.	0	14.5	0	10.0
rBCG-pSO246 0.1 mg/s.c.	0	15.0	0	0

2.4. ウイルス特異的な免疫反応のコドン最適化 rBCG の低投与量による誘導

20

コドン最適化遺伝子を伴う BCG 形質転換体の低投与量免疫化の可能性を検討した。30 匹の BALB/c マウスを各群 10 匹ずつ 3 群に分け、各群の 5 匹ずつに 0.01 および 0.1 mg の rBCG-p24Mu、rBCG-p24Wt および rBCG-pSO246 をそれぞれ皮下 (i.d.) 投与した。5 匹以上のマウスには生理食塩水のみを投与し、

正常な健康コントロールとした。投与後 10 週の時点で、免疫化動物のリンパ球増殖と、IFN- γ ELISPOT 分泌細胞数を調べた。これを 3 回繰り返し、それらの結果を集計した。

リンパ球増殖反応において、rBCG-p24Mu 免疫化マウスでは、プールされた
5 ペプチド#2 (p16-20) およびプールされたトータル p24 ペプチド#1-5 (p11-35) によって有意な活性 (刺激指数は 5.04 および 4.02) が得られた。0.1 mg の rBCG-p24Mu 免疫化では、プール#2 およびプール#1-5 に対するリンパ球増殖反応はそれぞれ 10.08 および 8.05 に増加した。一方、0.01 mg および 0.1 mg の rBCG-p24Wt 免疫化マウスではウイルス特異的な有意増加は何ら検出され
10 なかった (図 4A)。このような rBCG-p24Mu と rBCG-p24Wt 間における in vivo での増殖反応の違いは、プール#2 およびプール#1-5 について統計的に有意であった (それぞれ $p=0.0102$ および $p=0.0014$)。また、rBCG-pSO246 免疫化マウスでは如何なる増殖活性も検出されなかった。

さらに、ELISPOT アッセイによって p24 特異的 IFN- γ 分泌細胞を測定した。
15 0.1 mg の rBCG-p24Mu および rBCG-p24Wt 免疫化マウスにおいて、プールされた p24 ペプチド (プール#1-5) および組換え p24 特異的 SCFs が検出されたが、同量の rBCG-pSO246 免疫化マウスでは検出されなかった (図 4B)。rBCG-p24Mu 免疫化マウスでのこれらの反応は、ペプチド刺激では 375 ± 202 SFC/ 10^6 脾臓細胞であり、組換え p24 刺激では 483 ± 138 SFC/ 10^6 脾臓細胞
20 であり、rBCG-p24Wt での反応 (それぞれ 93 ± 25 および 227 ± 120 SFC/ 10^6 脾臓細胞) と比較してはるかに大であった。このような rBCG-p24Mu と rBCG-p24Wt 間の違いはまた、ペプチドおよび組換え p24 について統計的に有意であった (それぞれ $p=0.033$ および $p=0.031$)。なお、PPD 特異的な SFCs は試験した全てのマウスにおいて高度に検出された (670 ± 180
25 SFC/ 10^6 脾臓細胞)。

0.1 mg の rBCG-p24Mu、rBCG-p24Wt および rBCG-pSO246 で免疫化した全てのマウスから得た血清について、組換え p24 および PPD に対する終点抗体 ELISA を用いて、投与後 10 週時点での p24 抗原特異的抗体の産生を調べた (図 4C)。rBCG-p24Mu および rBCG-p24Wt で免疫化された動物では、
30 rp24 に対する抗体産生は一般的に低く、rBCG-p24Mu および rBCG-p24Wt で

免疫化されたマウス血清における抗 p24 抗体力価はそれぞれ 2^8 および $2^{6.75}$ であった。さらに、PPD 特異的抗体は、免疫化動物で似たように検出され、力価は約 2^{10} であった。以上のとおり、ウイルス特異的な細胞性免疫が初期の免疫反応において有意に誘導されたが、その抗体反応は低かった。

5

産業上の利用可能性

- 10 以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、抗原性タンパク質の発現量に優れ、その結果として通常の BCG ワクチンと同程度の使用量によっても、標的とする感染症や癌等に対して十分な免疫応答を誘導することのできる組換え BCG ワクチンが提供される。

15

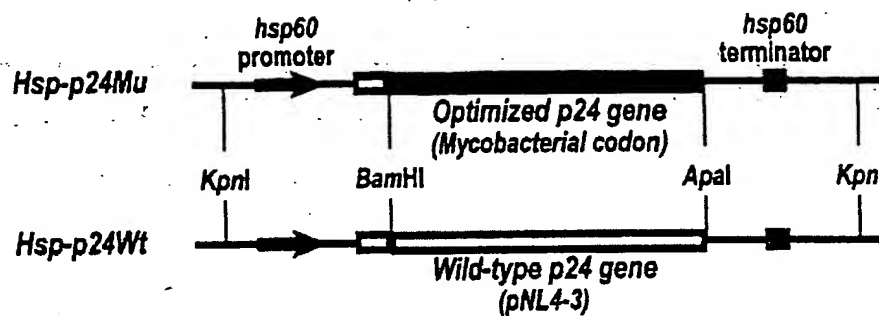
請求の範囲

1. 外来性の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有する発現ベクターによって形質転換された組換え BCG ワクチンであって、前記ポリヌクレ
5 オチドの各コドンの第3番目塩基がアミノ酸の種類を変化させることなく G または C に置換された改変型ポリヌクレオチドである組換え BCG ワクチン。
2. 改変型ポリヌクレオチドの各コドンの全塩基が、アミノ酸の種類を変化させることなく G または C を多く含むように置換されている請求項1の組換え BCG
10 ワクチン。

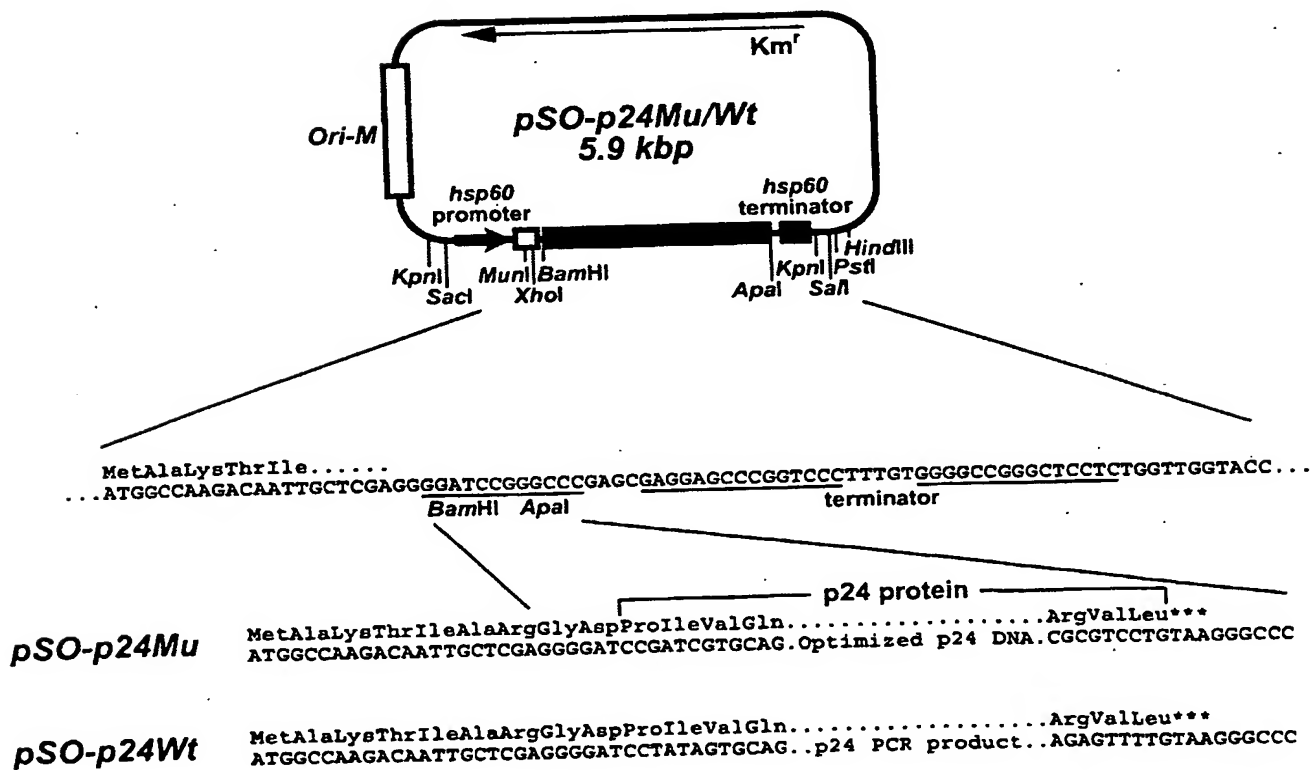
2/4

図 2

A

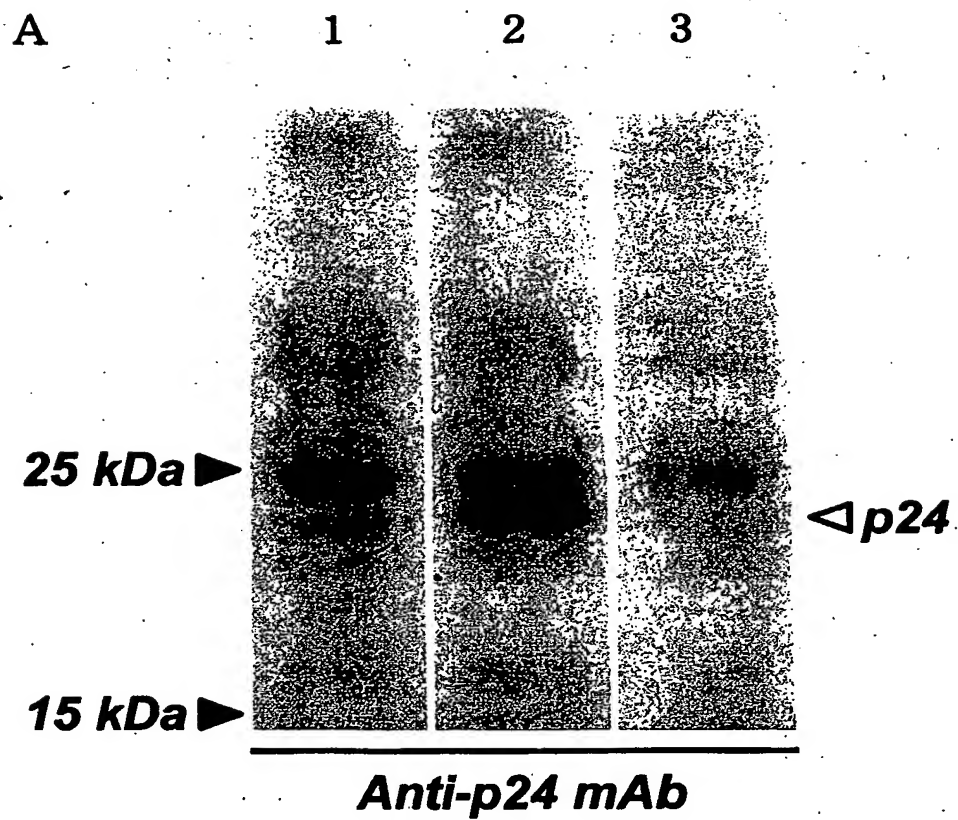


B



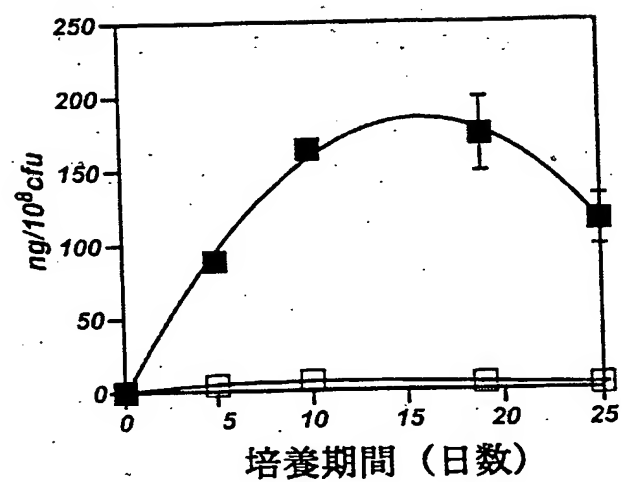
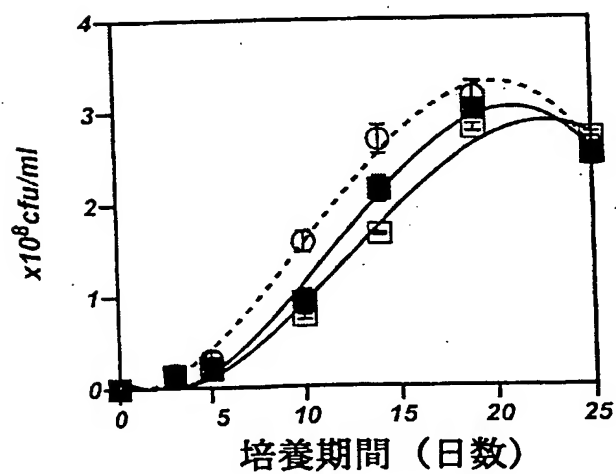
3/4

図 3



3/1/4

図 3 / 1

B**C**

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation, and
Director-General, National Institute of Infectious Diseases

<120> A recombinant BCG vaccine

<130> 02-F-049PCT

<140>

<141>

<150> JP2002-237610

<151> 2002-08-16

<160> 5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

aatggatcct atagtcaga acctc

25

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

aatgggccct tacaaaactc ttgctttatg g

31

<210> 3

<211> 706

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (5).. (700)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 3

ggat ccg atc gtc cag aac ctg cag ggc cag atg gtc cac cag gcc atc 49
 Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile
 1 5 10 15

tcg ccg cgc acc ctg aac gcc tgg gtc aag gtc gtc gag gag aag gcc 97
 Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala
 20 25 30

ttc tcg ccg gag gtc atc ccg atg ttc tcg gcc ctg tcg gag ggc gcc 145
 Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala
 35 40 45

acc ccg cag gac ctg aac acc atg ctg aac acc gtc ggc ggc cac cag 193
 Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln
 50 55 60

gcc gcc atg cag atg ctg aag gag acc atc aac gag gag gcc gcc gag 241
 Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu
 65 70 75

tgg gac cgc ctg cac ccg gtc cac gcc ggc ccc atc gca ccg ggc cag 289
 Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln
 80 85 90 95

atg cgc gag cct cgc ggc tcg gac atc gcc ggc acc acc tcg acc ctc 337
 Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu
 100 105 110

cag gag cag atc ggc tgg atg acc cac aac ccg ccg atc ccg gtc ggc 385
 Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr His Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly
 115 120 125

gag atc tac aag cgc tgg atc atc ctg ggc ctg aac aag atc gtc cgc 433

Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg
 130 135 140

atg tac tcg ccg acc tcg atc ctg gac atc cgc cag ggt ccg aag gag 481
 Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu
 145 150 155

ccg ttc cgc gac tac gtc gac cgc ttc tac aag acc ctc cgc gcc gag 529
 Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu
 160 165 170 175

cag gcg tcg cag gag gtc aag aac tgg atg acc gag acc ctg ctg gtc 577
 Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val
 180 185 190

cag aac gcc aac ccg gac tgc aag acc atc ctg aag gcc ctg ggt ccg 625
 Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro
 195 200 205

ggc gcc acc ctg gag gag atg atg acc gcc tgc cag ggc gtc ggc ggc 673
 Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly
 210 215 220

ccg ggc cac aag gcg cgc gtc ctg taa gggccc 706
 Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu
 225 230

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial Sequence: Synthetic oligopeptide

<400> 4

Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial Sequence: Synthetic oligopeptide

<400> 5

Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr
1 5 10 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K39/04, 39/00, C12N15/11, 15/31

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K39/00-39/39, C12N15/09-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMAGUCHI, Ryuji et al., Cloning and Characterization of the Gene for Immunogenic Protein MPB64 of Mycobacterium bovis BCG, Infection and Immunity, January, 1989, Vol.57, No.1, pages 283 to 288	1,2
Y	ANDERSSON, Siv G.E. et al., Codon usage in the Mycobacterium tuberculosis complex, Microbiology, April, 1996, Vol.142, No.4, pages 915 to 925	1,2
Y	Edited by The Japanese Biochemical Society, "Shin Seikagaku Jikken Koza (Vol.1) Tanpakushitsu VII -Tanpakushitsu Kogaku-", Tokyo Kagaku Dojin, 15 February, 1993 (15.02.93), pages 314 to 315	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
18 November, 2003 (18.11.03)Date of mailing of the international search report
09 December, 2003 (09.12.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10303

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JACOBS JR., William R. et al., Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid, Nature, 11 June, 1987 (11.06.87), Vol.327, No.6122, pages 532 to 535	1,2
Y	WO 90/00594 A2 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH), 25 January, 1990 (25.01.90), & AU 8938677 A & EP 424437 A3 & JP 4-500305 A & JP 2000-350578 A & US 5504005 A & US 5854055 A & US 5968733 A & US 6270776 B1 & US 6372478 B1 & CA 1339526 C	1,2
Y	EP 400973 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 05 December, 1990 (05.12.90), & EP 400973 B1 & JP 3-72888 A & JP 2903414 B2 & DE 69027956 E & US 6015696 A	1,2
Y	WO 90/15873 A1 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH), 27 December, 1990 (27.12.90), & AU 9058480 A & EP 478664 A1 & EP 478664 B1 & JP 4-506297 A	1,2
Y	WO 92/01783 A1 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE OF YESHIVA UNIVERSITY), 06 February, 1992 (06.02.92), & CA 2045842 A & AU 9183077 A & EP 556182 A1 & EP 556182 A4 & BR 9106658 A & JP 6-501607 A	1,2

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/04, 39/00, C12N15/11, 15/31

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/00-39/39, C12N15/09-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG) WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YAMAGUCHI, Ryuji <i>et al.</i> , Cloning and Characterization of the Gene for Immunogenic Protein MPB64 of <i>Mycobacterium bovis</i> BCG, Infection and Immunity, January, 1989, Volume 57, Number 1, pp. 283-288	1, 2

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 11. 03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4P

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ANDERSSON, Siv G.E. <i>et al.</i> , Codon usage in the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex, Microbiology, April, 1996, Volume 142, Number 4, pages 915-925	1, 2
Y	社団法人日本生化学会編, 新生化学実験講座(第1巻) タンパク質 VII-タンパク質工学-, 株式会社東京化学同人, 1993. 02. 15, pp. 314-315	1, 2
Y	JACOBS JR, William R. <i>et al.</i> , Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid, Nature, June 11, 1987, Volume 327, Number 6122, pages 532-535	1, 2
Y	WO 90/00594 A2 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 1990. 01. 25 & AU 8938677 A & EP 424437 A3 & JP 4-500305 A & JP 2000-350578 A & US 5504005 A & US 5854055 A & US 5968733 A & US 6270776 B1 & US 6372478 B1 & CA 1339526 C	1, 2
Y	EP 400973 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 1990. 12. 05 & EP 400973 B1 & JP 3-72888 A & JP 2903414 B2 & DE 69027956 E & US 6015696 A	1, 2
Y	WO 90/15873 A1 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 1990. 12. 27 & AU 9058480 A & EP 478664 A1 & EP 478664 B1 & JP 4-506297 A	1, 2
Y	WO 92/01783 A1 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE OF YESHIVA UNIVERSITY) 1992. 02. 06 & CA 2045842 A & AU 9183077 A & EP 556182 A1 & EP 556182 A4 & BR 9106658 A & JP 6-501607 A	1, 2